

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 60-025302
 (43)Date of publication of application : 08.02.1985

(51)Int.CI. H01P 1/02

(21)Application number : 58-133744 (71)Applicant : FUJITSU LTD

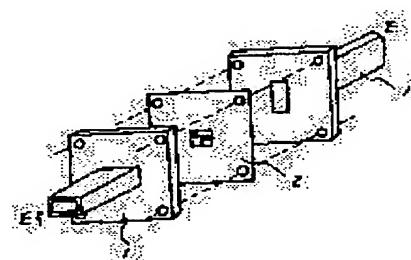
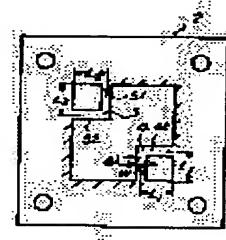
(22)Date of filing : 22.07.1983 (72)Inventor : SAGI YASUO
 HACHITSUKA HIROYUKI

(54) WAVEGUIDE TRANSMISSION ELEMENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To attain a broad band for a waveguide filter connecting a horizontally polarized waveguide and a vertically polarized waveguide by constituting said filter with a cutout window on the diagonal lines of which an inverse L-shaped conductor.

CONSTITUTION: A waveguide element 2 of the filter is connected between the horizontally polarized waveguide 1 and the vertically polarized waveguide 1'. The filter 2 has a transmission characteristic equivalent to that of a conventional twisted waveguide and has a special structure to attain broad band characteristic. That is, a square cutout window is formed at the center of the waveguide element 2 and also the inverse L-shaped conductor patterns 4, 5 are provided on the diagonal lines. The sides 41, 51 of the conductors are in parallel with the direction of an electric field and the sides 42, 52 of the conductors are orthogonal to the direction of the electric field. Further, the length of the sides 41, 42 and 51, 52 of the conductors are L1 and L2 respectively, and the L1 and L2 are slightly different so as to obtain a different resonance frequency.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-25302

(43)公開日 平成6年(1994)2月1日

(51)Int.Cl.⁵ 識別記号 広内整理番号 F I 技術表示箇所
C 0 8 B 37/00 7329-4 C
A 6 1 K 31/715 A B E 8314-4 C

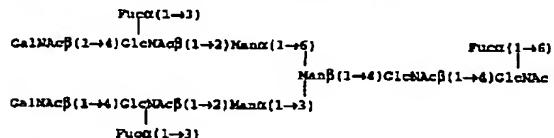
審査請求 未請求 請求項の数5(全8頁)

(21)出願番号	特願平5-50561	(71)出願人	590005922 イーライ・リリー・アンド・カンパニー ELI LILLY AND COMPANY アメリカ合衆国46285インディアナ州イン ディアナポリス市、リリー・コーポレイ ト・センター(番地の表示なし)
(22)出願日	平成5年(1993)3月11日	(72)発明者	ソーチー・ベティ・ヤン アメリカ合衆国46240インディアナ州イン ディアナポリス、メンロ・コート・イース ト・ドライブ8131番
(31)優先権主張番号	849868	(74)代理人	弁理士 青山 葵(外1名)
(32)優先日	1992年3月12日		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】オリゴ糖およびそれを含有する抗炎症剤

(57)【要約】(修正有)

【構成】具体例として右記の構造式で示される、Gal
NAc β (1→4)(Fuc α (1→3))GlcNAcという非還元
末端構造を伴うことを特徴とするオリゴ糖、ならびに当
該オリゴ糖を活性成分とする抗炎症剤。



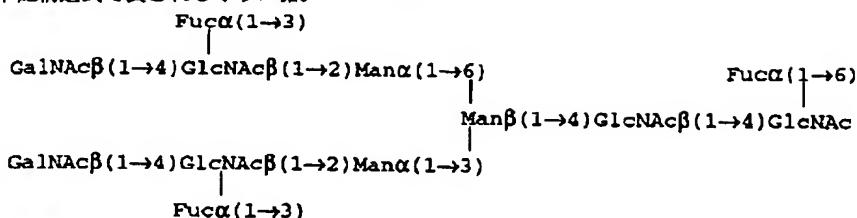
【効果】本発明オリゴ糖およびそれを有するペプチド
は幾つかの細胞接着受容体の高親和性リガンドとして作
用するので、細胞接着および炎症を防止または軽減す
る。

1

2

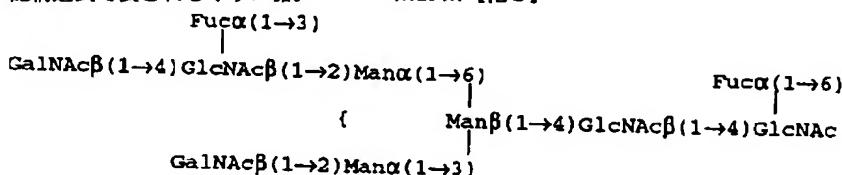
【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記構造式で表されるオリゴ糖。



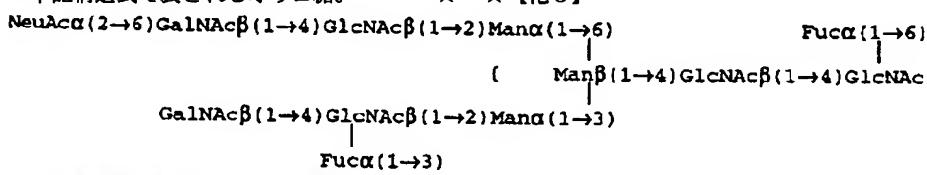
【請求項2】 下記構造式で表されるオリゴ糖。

※10※ 【化2】



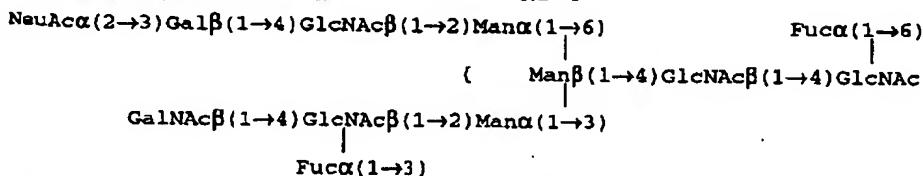
【請求項3】 下記構造式で表されるオリゴ糖。

★ ★ 【化3】



【請求項4】 下記構造式で表されるオリゴ糖。

★ ★ 【化4】



【請求項5】 請求項1、2、3または4に記載のオリゴ糖を活性成分とし、1または複数の医薬的に許容される担体、賦形剤または希釈剤を伴ってなる抗炎症剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は分子生物学に分野に属し、具体的には新規炭水化物構造をヒト腎293細胞中で生産する方法に関する。これらの新規炭水化物構造物は炎症の治療に使用することができ、また細胞接着を軽減するために使用することもできる。

【0002】ヒト腎293細胞はアデノウイルスで形質転換された細胞であって、組換えタンパク質の生産に有用である。この細胞は、ヒトプロテインC、ヒトプロテインSおよびトロンボモジュリン(thrombomodulin)、あるいは組織プラスミノーゲン活性化因子、レニンおよびヒトプロテインCの様々な誘導体などといった血液タンパク質産物の生産にとりわけ有用であることがわかっている。293細胞中で生産されるヒトプロテインCは、血漿由来のヒトプロテインC上に認められるグリコシリ化様式とは著しく異なるグリコシル化様式を示す。本発明は、293細胞中で生産されるヒトプロテインC分子が、 $\text{GalNAc}\beta(1 \rightarrow 4)(\text{Fuc}\alpha(1 \rightarrow 3))\text{GlcNAc}$ とい

う非還元末端分枝を含有する新規N-結合型オリゴ糖を含むことが新たに明らかにされたという事実に関連する。これらの構造は、ヒト免疫系の細胞接着受容体であるいくつかのセレクチン(selectin)に高い親和性で結合することができる。この特異的リガンド(配位子)親和性は、293細胞によって生産されるこれらの新規オリゴ糖が細胞接着および組織炎症の軽減に有用であることを示している。

【0003】本明細書で使用する用語を以下に定義する。

40 Asn : アスパラギン
 Gal : ガラクトース
 Fuc : フコース
 GalNAc : N-アセチルガラクトサミン
 GlcNAc : N-アセチルグルコサミン
 Man : マンノース
 NeuAc : N-アセチルノイロマニン酸

【0004】本発明は、そのペプチドの発現に適した条件下でグリコシリ化され得るペプチドをヒト腎293細胞をインキュベートして発現させ、次いでその細胞または細胞培養上清からそのペプチドを回収することによつ

3

て、 $\text{GalNAc}\beta(1-4)(\text{Fuc}\alpha(1-3))\text{GlcNAc}$ という構造を伴うオリゴ糖を含有するペプチドを生産する方法を包含する。293細胞中で生産されるヒトプロテインC分子はN-結合型オリゴ糖の非還元末端にこれらの構造を含有する。また本発明は、293細胞中で生産された上記ペプチドからこれらの新規オリゴ糖をさらに単離する方法をも包含する。このようにして生産されるペプチドおよび/またはオリゴ糖を用いて、ある種の細胞接着受容体の高親和性リガンドとして作用させることができる。このようなりガンド特異性は、細胞接着を防止または軽減することによって組織炎症を防止または軽減するために、上記のペプチドおよび新規オリゴ糖を使用することができるということを示している。

【0005】ヒト腎293細胞(ATCC CRL 1573)は、アデノウイルス5の形質転換遺伝子を保持しこれを発現させる、形質転換された初期胚ヒト腎細胞である。これらの細胞は数種の重要な遺伝子産物を発現させるために使用されており、またいくつかの異なる学術的研究所および工業的研究所によって使用されている。例えばYan, 米国特許第4981952号とBangら, 米国特許第4992373号は共に、ヒトプロテインCを生産するための上記293細胞系の使用を開示している。293細胞にはこの細胞系中で生産されるペプチド上に新規かつ有用なオリゴ糖を創出するための酵素機構が含まれていることを新たに発見した。これらの新規オリゴ糖は、それらの製造法および使用法と共に本発明に包含される。

【0006】ヒトプロテインC(HPC)はセリンプロテアーゼのチモーゲン(酵素前駆体)として血漿中を循環する。プロテインCは、内皮細胞表面受容体トロンボモジュリンとの複合下にあるトロンビンによって活性化される。活性型ヒトプロテインC(aPC)は因子V aおよびVIII aを不活化することができるので強力な抗凝固活性を有する。本明細書において用語「ヒトプロテインC」はこの分子の上記チモーゲン型と活性型の両方を意味する。プロテインCはトロンビン生成の調節に決定的な役割を果たし、いくつかの血栓症の治療に効果的であり得る。ヒトプロテインCはこの分子上の4部位(具体的には軽鎖上の位置Asn 97 および重鎖上の位置Asn 248, Asn 313 およびAsn 329)でのN-グリコシル化によって翻訳後修飾される。血漿由来のHPCの完全な炭水化物構造はまだ報告されていないが、293細胞中で組換え生産されたHPC(rHPC)上に認められるオリゴ糖は血漿由来のHPC上に認められるものとは著しく異なる。例えば、rHPCは血漿由来のHPCと比較してフコース含量が5倍高く、NeuAc含量が2倍低い。さらにrHPCは1モルあたり2.6モルのGalNAcを含有するが、血漿由来のHPCはGalNAcを含有しない。

【0007】本発明はペプチドのAsn残基に結合した特

4

定のオリゴ糖に限定されない。オリゴ糖はN-グリコシリ化を介してペプチドに結合していることもあるし、O-グリコシリ化を介してペプチドに結合していることもある。オリゴ糖は糖脂質やプロテオグリカン内にも認められ、グリピエーション(glypiation)を介して膜結合タンパク質に付加され得る。本明細書において、「グリコシリ化され得る」という用語はAsn残基のN-グリコシリ化に限定されるのではなく、ペプチドや脂質が生体内でグリコシリ化されるすべての機構を包含する。

【0008】293細胞中で生産されたrHPC上に認められる主なオリゴ糖をディオネックス(Dionex)HPA E-PAD系での指紋法にかけると図1に記載の特性図を示す。主要ピーク1に対応するオリゴ糖は天然の二分岐オリゴ糖であり、両分枝共に、フコシル化されたキトビオース-トリマンノシル核に結合した $\text{GalNAc}\beta(1-4)(\text{Fuc}\alpha(1-3))\text{GlcNAc}\alpha(1-2)-$ という構造を含む。検討しここに開示した他の10種のオリゴ糖のうちの数種はやはり、GalNAcを含有する新規N-結合型構造を示す。ピーク2, 7および11のオリゴ糖の予測構造も、フルコシル化されたキトビオース-トリマンノシル核の少なくとも1つの分枝上に新規構造を含有する。さらに、ピーク15, 20および23のオリゴ糖の構造は1-4結合したGalNAc残基を含有する。293細胞はこれらの基質の生産に必要な特異的酵素を含有しているので、これらの新規オリゴ糖構造が293細胞系によって生産されるのである。

【0009】ヒト腎293細胞は $\alpha(2-3)$ シアリルトランスフェラーゼと $\alpha(2-6)$ シアリルトランスフェラーゼの両方を持っているようである。上記 $\alpha(2-6)$ シアリルトランスフェラーゼはGalNAc残基のシアリル化に関して特異的であるのに対して、上記 $\alpha(2-3)$ シアリルトランスフェラーゼはGal残基のシアリル化に関して特異的である。293細胞によって発現される $\alpha(1-3)$ フコシルトランスフェラーゼはGalNAcを含有する基質に作用することができる。上記 $\alpha(2-6)$ シアリルトランスフェラーゼと上記 $\alpha(1-3)$ フコシルトランスフェラーゼの作用はオリゴ糖の個々の分枝のいずれについても互いに排他的であり、それゆえに一旦GalNAcがシアリル化されると、同じ分枝中のGalNAc残基の $\alpha(1-3)$ フコシル化が妨げられるようである。逆に、一旦GalNAcがフコシル化されると、同じ分枝上の同じGalNAc残基は上記 $\alpha(2-6)$ シアリルトランスフェラーゼによってシアリル化されることができない。

【0010】293細胞は極めて高いレベルの $\alpha(1-6)$ フコシルトランスフェラーゼ活性を発現されるので、293細胞は炭水化物部分の不均質性がかなり低い組換え糖タンパク質分子を生産する。rHPCから単離された25個のオリゴ糖ピークすべての結合分析では、還元末端を伴う4, 6-結合したGlcNAcのみが認められた。還元末端を伴う4-結合したGlcNAcは全く検出

5

されなかった。このことから、すべての上記N-結合型オリゴ糖のキトビース核が実質上100%フコシル化されていたことは明らかである。293細胞由来のrHPC上の11種の主要オリゴ糖の解明によって、Yanら, 1990, *BioTechnology* 8:655-660が報告したrHPCの異常なグリコシル含量が説明される。この分子の高コース含量は、すべてのN-結合型オリゴ糖のキトビース核がフコシル化されるという事実および上記11種のN-結合型オリゴ糖のうちの4種の分枝中のGlcNAc残基がフコシル化されているという事実によって説明することができる。ピーク2中に認められるオリゴ糖を除いて、rHPC中のGalNAc残基はすべてN-グリコシル化されたオリゴ糖中に認められ、通常はN-結合複合型オリゴ糖中にGalのみが認められる分枝位置中のみ認められる。本明細書において、分枝および分岐という用語は複数の分枝および分岐を包含し、その逆もまた同じである。

【0011】293細胞中に認められる上記フコシルトランスフェラーゼの作用と、その結果としてこの細胞系中でなされるオリゴ糖のGlcNAc残基の $\alpha(1-3)$ フコシル化は、本発明のもう1つの側面を明らかにする。 $\alpha(1-3)$ フコシル化されたGlcNAcを含有する構造はセレクチンの結合に関して有用なりガンド(配位子)である。セレクチンは免疫系の接着受容体の一種である。内皮内層に対する白血球の接着は炎症応答における不可欠の段階である。 $\alpha(1-3)$ フコシル化されたGlcNAcを含有するオリゴ糖は、2種類のセレクチン、即ちCD62とELAM-1(内皮-白血球接着分子1)に結合する。細胞接着検定は、このような新規オリゴ糖を含有するペプチドの添加(もしくはそのオリゴ糖単独の添加)が上記セレクチンを結合することによって細胞接着を軽減または防止し得ることを示している。細胞接着が軽減または防止されるのであれば、炎症応答も軽減または防止され得る。

【0012】このようなセレクチン認識リガンドを生産するために必要な酵素機構を293細胞が持っているという発見は、炎症応答と細胞接着に関連する病状の治療にとって重要な有用な手段を医学界に提供することになる。293細胞中で生産される糖タンパク質およびオリゴ糖は、この発見ゆえに、炎症または細胞接着の治療に用いることができる。様々な健康障害を治療するためにrHPCを使用する方法はBangら, 米国特許第4775624号に開示されている。293細胞が構成的に生産する幾つかの糖タンパク質も新規な構造を示し得るので、293細胞によって生産される新規糖タンパク質は組換え生産されるタンパク質に限定されない。さらに、本発明は細胞接着と炎症を防止または軽減するために糖ペプチドを使用することに限定されない。よく知られている様々な手法で糖タンパク質からそのオリゴ糖を取り

6

出し得ることは、当業者には理解されるであろう。次いでそのオリゴ糖を医薬的に許容される希釈剤に入れて、細胞接着または炎症を被っている患者に投与することができる。

【0013】本発明が293細胞中でのヒトプロテインCのオリゴ糖の生産に限定されることは、当業者には理解されるであろう。グリコシル化され得るペプチドはいずれも、当該技術分野でよく知られている技術を使って293細胞中に形質転換し、これを発現させることができる。そのようなペプチドの例にはヒトプロテインS、ヒトトロンボモジュリン、組織プラスミノーゲン活性化因子、レニンおよびヒトプロテインCの誘導体が含まれるがこれらに限定されない。293細胞におけるヒトプロテインSの生産はYan, 米国特許第4981952号に開示されている。ヒトプロテインCの数種の誘導体をコード化する遺伝子は欧州特許出願第91301450.2号に開示されている。ヒトトロンボモジュリンの天然型と誘導体型をコード化する遺伝子は欧州特許出願第90308826.8号とWenら, 1987, *Biochemistry* 26:4350に開示されている。これらの遺伝子はいずれも293細胞中に形質転換することができ、その細胞を遺伝子発現とペプチド/オリゴ糖生産に適した条件下で培養することができる。

【0014】以下の実施例は本発明を例示するために記載するのであって、本発明を限定するものであると見なしてはならない。

【0015】 【実施例】

実施例1：293細胞におけるヒトプロテインCの生産
 当業者によく知られている技術(例えばYan, 米国特許第4981952号に説明されている技術など)を用いて、ヒト腎293細胞中で組換えヒトプロテインC(rHPC)を生産した。ヒトプロテインCをコード化する遺伝子はBangら, 米国特許第4775624号に開示され、特許請求されている。293細胞中でヒトプロテインCを発現させるために使用したプラスミドは、Bangら, 米国特許第4992373号に開示されているプラスミドpLPCである。プラスミドpLPCの構築についても欧州特許公開第0445939号とGrinnellら, 1987, *BioTechnology* 5:1189-1192に記述されている。簡単に述べると、このプラスミドを293細胞中にトランスフェクトし、次いで安定な形質転換体を同定し、継代培養した。次に、最も高い発現レベルを示したクローンを2核オプチセル発酵槽(2 core Opticell fermenter)中で足場依存的に生育させた。すべての発酵に血清非含有培地を使用した。血清非含有培地を調製するために、下記の成分を高純度水100リットルに溶解した。

ダルベッコ変法イーグル培地(#200-2010) 1350g

7

ハムF 1 2 培地(#63N3085)	
重炭酸ナトリウム	
デキストロース	
エタノールアミン	
亜セレン酸ナトリウム 0.5M	
ビタミンK (1%)	
L-グルタミン	

8

478 g
432 g
468 g
55 ml
180 ml
180 ml
81 g

この溶液を180リットルにし、3N HClを用いてpHを7.2に調節した。37℃での発酵の後、Yan,米国特許第4981952号の技術によってヒトプロテインCを培養液から分離することができる。このように生産されたヒトプロテインCは不活性化されたチモーゲン型で使用することができるし、あるいは当業者によく知られている手法でこれを活性化することもできる。

【0016】実施例2：293細胞中で生産されたrHPCのオリゴ糖構造

293細胞中で生産されたrHPCの新規構造を解明するために使用した手法の多くはYanら, 1990, *BioTechnology* 8:655-651に記述されている。脱塩し凍結乾燥したrHPCをまず2mM EDTAと6M グアニジン塩酸塩を含有する0.2M トリス緩衝液(pH 8.6)中で還元し、カルボキシメチル化した。この溶液を50mM 重炭酸アンモニウムに対して充分に透析した後、凍結乾燥した。この変性したrHPCをリン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.6)中に再懸濁した後、N-グリカナーゼ(Genzyme)をrHPC 8~9mgあたり12単位の割合で加えた。この溶液を37℃で72時間インキュベートした後、50mM 重炭酸アンモニウムで平衡化したバイオゲル(Bio-gel)P6カラム上で、酵素的に放出されたN-結合型オリゴ糖を脱グリコシル化されたrHPCから分離した。脱グリコシル化されたrHPCを含有する分画をOD_{280nm}で監視した。

【0017】グリコシル組成分析によって監視したオリゴ糖を含有する分画を集めて凍結乾燥した。20mM 酢酸ナトリウム、100mM NaOHで平衡化したAG6保護カラム付きAS6カラム(4.6×250mm)を用いるディオネックス(Dionex)HPAE-PAD II系で、上記オリゴ糖を分離した。3分後、酢酸ナトリウムを20分間で60mMに増大させ、さらに120分間で200mMに増大させ、40分間で400mMに増大させ、再び5分間で800mMに増大させた。NaOH濃度を100mM一定に保ち、カラム流速を1ml/分とした。カラム後0.3M NaOHを0.5ml/分の流量で流した。

【0018】PAD検出器の後にアニオン微小膜抑制器(anion micromembrane suppressor)を取り付けた。このアニオン微小膜抑制器に9ml/分で30mM 硫酸を流すと、AG6-AS6カラムからの溶出物を中和し、部分的に脱塩するのに充分であった。各オリゴ糖ピークを、製造者の指示に従って調製したオンガード(On 50

Guard) Hカートリッジ(Dionex)でさらに脱塩した。

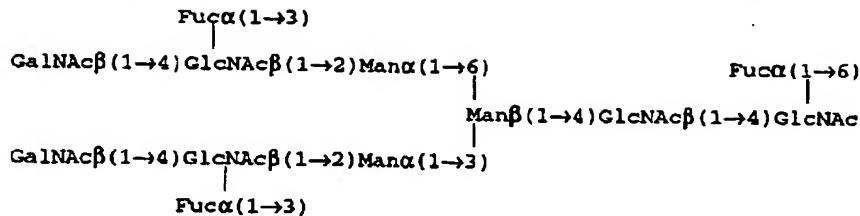
【0019】脱塩したオリゴ糖約1~10μgを、結合分析のためのPMMA誘導体を調製する際の出発物質として使用した。1M NH₄OH中の10mg/ml NaBH₄ 25μlを用いて、オリゴ糖を室温で2時間予備還元した。冰酢酸20μlを用いてこの反応を停止させた後、窒素下でメタノール中の10%酢酸との同時留去を繰り返すことによってホウ酸塩を除去した。還元されたオリゴ糖を、Costello及びVath, 1990, *Meth. Enzy mol.* 193:738-755に記述されているCiucano及びKerek, 1984, *Carbohydr. Res.* 131:209-217の改良法で過メチル化(パーメチル化)した。過メチル化したオリゴ糖を2M TFA中100℃で2時間加水分解し、次いで回転留去(ロータリーエバボレーション)で乾燥した。1M NH₄OH中20mg/ml濃度のNaBD₄を40℃で1.5時間加えることによって重水素還元を達成した。冰酢酸で中和することによってこの反応を停止させた。窒素下でメタノール中の10%酢酸と同時に留去することによってホウ酸塩を除去した。酢酸無水物と共に室温で30分間インキュベートすることによってアセチル化を行った。オリゴ糖の最終的なPMMA誘導体を塩化メチレンで抽出し、窒素下で乾燥することによって濃縮し、酢酸エチル10~20μlに再溶解した。

【0020】ヒューレット・パッカード(Hewlett Packard) GC 5890-MSDを用いて気相クロマトグラフィー-質量分析(GC-MS)を行った。上記PMMA誘導体を酢酸エチルに溶解した後、1ml/分のヘリウム流量でDB-5カラム(0.25mm×30m, J & W Scientific)に注入した。試料を80℃のカラム温度で注入し、この温度を2分間維持した後、30℃/分の速度で150℃まで昇温させ、次いで再び2℃/分の速度で150℃から240℃まで昇温させ、240℃を10分間維持した。EI四重極モードで上記質量分析装置を使用した。このGC-MSを溶出時間に関して標準品を用いて較正した。

【0021】ピーク1のオリゴ糖の構造をグリコシル組成結合分析およびH-NMRによって解明した。他の10種の主要オリゴ糖の構造をグリコシル組成および結合分析に基づいて予測した。このようにして解明されたオリゴ糖構造を以下に記載する。

【0022】ピーク番号1の炭水化物構造
【化5】

9

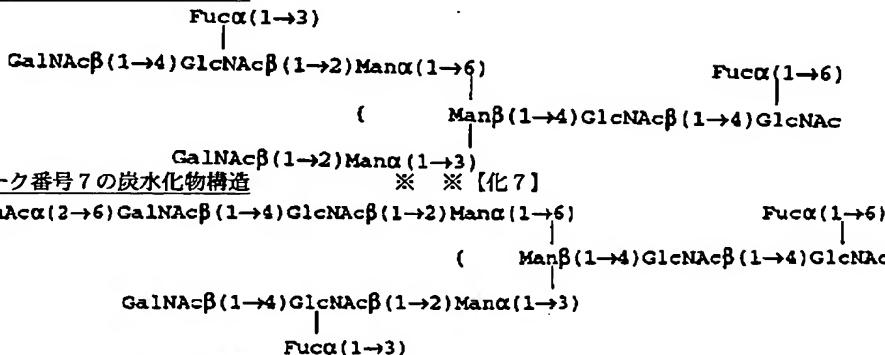


10



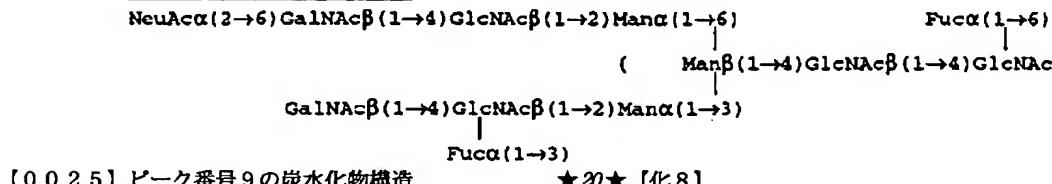
【0023】 ピーク番号2の炭水化物構造

* * 【化6】



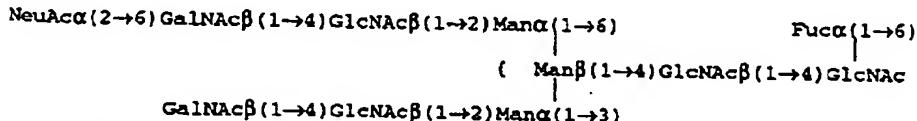
【0024】 ピーク番号7の炭水化物構造

* * 【化7】



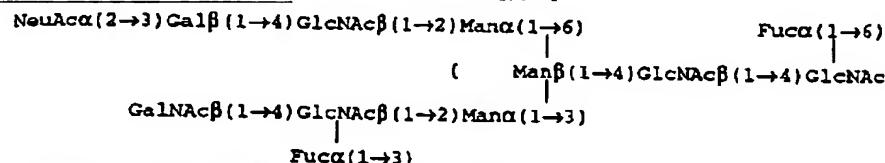
【0025】 ピーク番号9の炭水化物構造

★20★【化8】



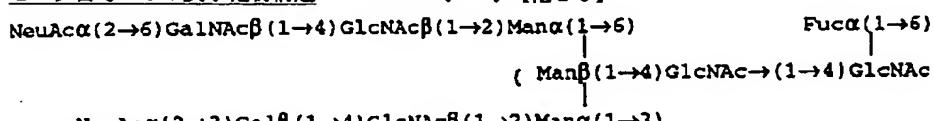
【0026】 ピーク番号11の炭水化物構造

☆ ☆ 【化9】



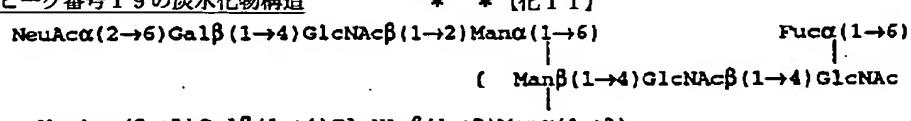
【0027】 ピーク番号15の炭水化物構造

◆ ◆ 【化10】



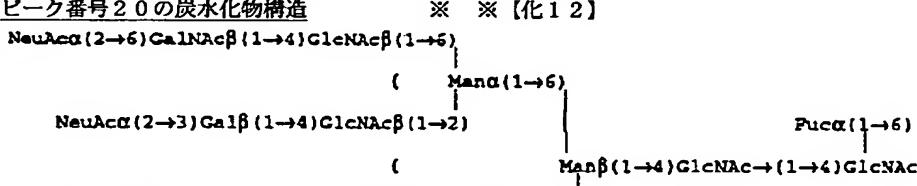
【0028】 ピーク番号19の炭水化物構造

* * 【化11】



【0029】 ピーク番号20の炭水化物構造

* * 【化12】



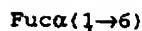
【0030】 ピーク番号23の炭水化物構造

50 【化13】

11

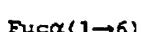
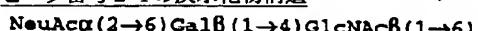


12



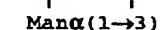
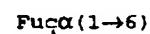
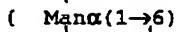
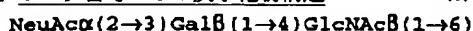
【0031】 ピーク番号24の炭水化物構造

* * 【化14】



【0032】 ピーク番号25の炭水化物構造

※ ※ 【化15】



【0033】 実験例3：インピトロ細胞接着検定

ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)またはヒト大動脈内皮(HAE)をクローニングティックス(Clonetics, サンジエゴ)から入手し、クローニングティックスから供給されたE BM培地中で生育させた。37℃で終夜インキュベートした後に全面成長単層が得られる密度で、細胞を96穴プレートに接種した。総体積100~150μl中の結合検定に先立って、単層を腫瘍壞死因子(TNF)20ngの存在下または非存在下で4~6時間インキュベートした。結合の阻害について調べるために、プロテインCまたは単離したその炭水化物の試料を、リン酸緩衝食塩水(PBS)または水中20μlまでの体積で3つのウェルに加えた後、さらに20~25分間インキュベートした。インキュベーション後、三重水素でラベルした

U937細胞を1ウェルあたり1~3×10(6)細胞の割合で50μlの体積で加えた。上記U937細胞は、³H-チミジンを最終濃度1μCi/mlになるように添加した後18~20時間インキュベートすることによって三重水素ラベルした。細胞を使用する前に過剰のラベルを除去するべくPBSで洗浄した。上記内皮細胞と共にラベルしたU937細胞を20分間インキュベートした後、ウェルを吸引し、カルシウム含有PBSで4回洗浄した。0.25%SDS/0.1N NaOHを攪拌しながら5分間添加することによって、単層および接着したU937細胞を可溶化した。可溶化した細胞のシンチレーション計数によって結合のレベルを決定した。

【表1】

40

実験番号	aPC(μg/ml)	阻害率(%)*
1(HUVECS) ^b	32	なし
1(HUVECS)	120	70(12) ^c

13		14
2(HAE)	120	なし
2(HAE)	240	77(30)
3(HAE)	120	54(18)

* TNFによる内皮細胞予備処理の有無間のU937細胞結合の差を100%阻害とする。

†細胞系。

*

* 確固内の数字は標準誤差を示す。

【表2】

実験番号	オリゴ糖(μM)	阻害率(%)*
1(HAE)†	5.75	なし
1(HAE)	11.5	22(0.5)‡
1(HAE)	23	16(4)
2(HUVECS)	17.25	19§
2(HUVECS)	34.5	63

* TNFによる内皮細胞予備処理の有無間のU937細胞結合の差を100%阻害とする。

†細胞系。

‡確固内の数字は標準誤差を示す。

§一点測定からは誤差が計算されない。

【図面の簡単な説明】

【図1】 293細胞中で生産されたヒトプロテインC分子上に認められる主な炭水化物のクロマトグラフ。炭水化物構造が解明された主要ピークに数字を付してある。

20

【図1】

